



Doctoral Thesis

## Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der Chorismat Mutase Isozyme aus *Arabidopsis thaliana*

**Author(s):**

Kuhn, Roger Michael

**Publication Date:**

1999

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003824982> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 13299

**Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der Chorismat  
Mutase Isozyme aus *Arabidopsis thaliana***

DISSERTATION  
zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZUERICH

vorgelegt von  
Roger Michael Kuhn  
Dipl. natw. ETH  
geboren am 25. April 1969  
von Dübendorf (ZH)

Aufgenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. N. Amrhein, Referent  
Prof. Dr. K. Apel, Korreferent  
PD Dr. J. Schmid, Korreferent

Zürich, 1999

## **ZUSAMMENFASSUNG**

In höheren Pflanzen ist ein vollständiger Shikimatweg für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) in den Plastiden allgemein akzeptiert. Der zu Phe und Tyr führende Seitenweg beinhaltet als erste Schritt die von der Chorismat Mutase (CM) katalysierte Umlagerung von Chorismat zu Prephenat. Als einziges Enzym des Shikimatweges sind für die CM aus *Arabidopsis thaliana* neben cDNAs für zwei plastidär lokalisierten Isoformen (CM1 und CM3) auch eine cDNA für ein cytosolisches Isozym beschrieben (CM2). Die in dieser Arbeit gewählten Ansätze zielten darauf ab, den Fluss von Metaboliten durch die CM-katalysierte Reaktion zu reduzieren, um insbesondere mehr über die unbekanntere physiologische Funktion von CM2 zu erfahren.

Durch die von *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte T-DNA Transformation wurden ins Genom von *Arabidopsis thaliana* verschiedene, vom 35S-Promotor kontrollierte Antisense-Konstrukte eingebracht, die gegen unterschiedliche Bereiche der mRNA von CM1 und CM2 gerichtet waren. Von Pflanzen mit Antisense-Konstrukten aus dem 5'-Ende der jeweiligen CM-cDNA wurden in der T<sub>3</sub>-Generation 73 homozygote Linien für CM1 (*AtCM1-5'-as*) und 79 für CM2 (*AtCM2-5'-as*) identifiziert. Southern-Blot Analysen zeigten, dass die zufällig ausgewählten 19 *AtCM1-5'-as*- und 20 *AtCM2-5'-as*-Linien das Produkt unabhängiger Transformationsereignisse mit zwischen 1 bis 8 verschiedenen T-DNA Insertionsstellen pro Linie sind. Die Quantifizierung der CM-Transkripte durch Dot-Blot Analyse ergab eine maximale Reduktion des mRNA Gehalts von 34 % für CM1 und 46 % für CM2, was phänotypisch keine Auswirkungen auf die Pflanzen hatte. Auch war bei diesen Pflanzen keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber

dem Pathogen *Fusarium oxysporum* feststellbar. Durch Kreuzung wurden Linien mit den beiden Konstrukten *AtCM1-5'-as-* und *AtCM2-5'-as* erhalten, welche eine den Parentallinien entsprechende Reduktion des CM-mRNA Gehalts aufwiesen und phänotypisch mit dem Wildtyp identisch waren.

Die über das *Arabidopsis Biological Research Center* verfügbaren 12 000 *A. thaliana* Linien mit T-DNA Insertionen wurden auf T-DNA Insertionen in den Genen von CM1 und CM2 hin untersucht. Trotz Wiederholung der Experimente bei unterschiedlich stringenten 'Screening'-Bedingungen liessen sich keine entsprechenden 'knock-out' Mutanten identifizieren.

Um die Verfügbarkeit von Prephenat in der Pflanze zu reduzieren, wurde versucht, die monofunktionelle Prephenat Dehydratase (PDH) aus *Pseudomonas aeruginosa* unter der Kontrolle des 35S-Promotors im Cytosol und in Plastiden von *A. thaliana* zu exprimieren. Nachfolgende *in vitro* Keimungsexperimente mit dem Wildtyp weisen jedoch auf eine konzentrationsabhängige toxische Wirkung des Reaktionsproduktes Phenylpyruvat zwischen 10 und 40  $\mu\text{M}$  hin. Dieser Befund könnte auch erklären, wieso keine Linien mit einem PDH-Konstrukt regeneriert werden konnten.

Adamantan-1-Phosphonat (A1P) ist ein Uebergangszustandsanalogon und Inhibitor der CM-katalysierten Reaktion. Durch Keimungsversuche von *A. thaliana* in Gegenwart von A1P sollten Hinweise erhalten werden, wie sich ein Mangel an Prephenat phänotypisch auf die Pflanze auswirkt. Bei 0.1, 1, 10 und 50  $\mu\text{M}$  A1P war gegenüber der Kontrolle nach 10 Tagen unter sterilen Kulturbedingungen kein Unterschied im Phänotyp sichtbar.

## **ABSTRACT**

In higher plants, the presence of a plastidic shikimate pathway for the biosynthesis of the aromatic amino acids phenylalanine (Phe), tyrosin (Tyr) and tryptophan (Trp) is generally accepted. The first step of the Phe/Tyr branch is the rearrangement from chorismate to prephenate, catalyzed by chorismate mutase. It is the only enzyme of the shikimate pathway of which not only cDNAs of two plastidic isoforms (CM1, CM3) but also of a cytosolic isozyme (CM2) have been cloned from *Arabidopsis thaliana*. The aim of this work was to reduce the flux of metabolites through the CM-catalyzed reaction by different approaches and thereby mainly characterize the unknown physiological function of CM2.

Antisense constructs, directed against different regions of the CM1- and CM2-transcripts and controlled by the 35S-promotor, were transformed into *Arabidopsis thaliana* using the *Agrobacterium tumefaciens* mediated T-DNA transformation method. Plants carrying antisense constructs derived from the 5'-end of the corresponding cDNAs were used to generate 73 homozygous lines for CM1 (*AtCM1-5'-as*) and 79 for CM2 (*AtCM2-5'-as*) in the T<sub>3</sub> generation. Southern blot analysis confirmed that the randomly picked 19 *AtCM1-5'-as* and the 20 *AtCM2-5'-as* lines were independent transformants with 1 to 8 T-DNA insertion loci per line. Dot blot analysis was used to quantify the CM-mRNA levels in those lines: the highest reduction was 34 % for CM1- and 46 % for CM2-specific transcripts, respectively. These plants were neither phenotypically altered nor were they more susceptible to the pathogen *Fusarium oxysporum*. Crossing experiments were performed to generate lines containing both antisense constructs, i.e. *AtCM1-5'-as*

and *AtCM2-5'*-as. The CM-mRNA levels in these lines were reduced to an extent similar to that of the parental lines.

12 000 *A. thaliana* lines with T-DNA inserts, available from the *Arabidopsis Biological Research Center*, were screened for T-DNA insertions in the CM1- and CM2-genes. The experiments were repeated twice, using high and low stringency screening conditions, but no CM-knock out mutants could be identified.

An attempt was made to reduce the availability of prephenate in the plant cell by expressing the monofunctional prephenate dehydratase (PDH) from *Pseudomonas aeruginosa* under the control of the 35S-promotor in the cytosol and plastids of *A. thaliana*. Subsequent *in vitro* germination studies with wildtype seeds suggested a dose-dependent toxic effect of phenylpyruvate, the product formed by PDH, between 10 and 40  $\mu\text{M}$ . This could explain why it was not possible to regenerate any PDH-lines.

Adamantane-1 phosphonate (A1P) is a transition state analog and inhibitor of the CM-catalyzed reaction. *A. thaliana* was grown *in vitro* in the presence of different concentrations of A1P to induce a phenotypical change caused by prephenate deficiency. However, 0.1, 1, 10 and 50  $\mu\text{M}$  A1P had no effect after 10 days compared to untreated plants.